

BRUCELLA ovis: DETERMINACION DE SU PREVALENCIA EN URUGUAY

Silva Paravis, M . Muller, G . Bermudez, J . Errico F

RESUMEN

Se evaluaron 2633 carneros pertenecientes a 80 establecimientos que correspondieron a seis (6) departamentos donde se encontraban la mayor cantidad de ovinos del país. Para la realización del muestreo se utilizaron métodos estadísticos, se estratificó la muestra de acuerdo a la población existente en cada predio, la misma fue de dos(2%) de la población ovina de los seis (6) departamentos estudiados.

Se efectuó la revisión clínica del aparato reproductor y se extrajo sangre para realizar las pruebas serológicas de ELISA y Gel Difusión.

Se presentan los resultados obtenidos en los diferentes estratos por Enzimoimmunoensayo (Elisa) con sensibilidad de (93.9%) y especificidad de (96.5%).

La prevalencia determinada por ELISA para Brucella Ovis (con 95% de confiabilidad) fue de 13.2%, en tanto la dispersión (con 95% de confiabilidad) fue de 32.5%. Las diferencias encontradas entre las técnicas serológicas no fueron estadísticamente significativas.

Se presentan además cuadros comparativos de resultados de análisis clínicos y pruebas serológicas.

El objetivo del presente trabajo fue, determinar la prevalencia de Brucella Ovis en el país y comparar los resultados obtenidos por los diferentes métodos diagnósticos con la finalidad de adoptar un criterio diagnóstico a utilizar en el país.

D.L.A. VE "Miguel C. Rubino"

INTRODUCCION

Desde el siglo pasado la producción ovina constituye una de las más importantes actividades productivas del Uruguay. Representa el 16 % de la producción agrícola ganadera generando divisas por un 25% ((1). Es por lo tanto imprescindible para nuestro país contar con rebaños con alto nivel sanitario, para aumentar la calidad y el volumen de la producción ovina

Desde que se aisló por primera vez la *B. ovis* en Uruguay (2), la brucelosis ovina es una de las patologías diagnosticadas más comunmente (2,3,4,5). Se conoce bastante en cuanto a los inconvenientes que acarrea dicha enfermedad en una majada en lo que respecta a: disminución de fertilidad de los carneros, descenso de la tasa de nacimientos, infertilidad fundamentalmente en hembras de primer servicio, abortos tardíos y mortalidad neonatal. Sin embargo no conocemos la prevalencia de la enfermedad en nuestro país, por lo que se hace necesaria la realización de estudios epidemiológicos en gran escala (6).

El diagnóstico de ésta enfermedad se basa en la palpación para determinar si existe epididimitis, exámen bacteriológico del semen y test serológicos. Sin embargo algunos carneros infectados no presentan epididimitis y pueden portar el agente en forma intermitente, por lo que los test serológicos son más útiles como herramientas de diagnóstico (7).

Las técnicas más utilizadas son fijación del complemento (8) e inmunodifusión en gel (9) (10). Con el advenimiento de las técnicas enzimoimmunológicas, son varios los autores que han descrito técnicas de ELISA para el diagnóstico de la Brucelosis (11), (12), (13), (14), (15), (16). Las técnicas serológicas son más adecuadas cuando se desea estudiar grandes poblaciones de animales y el ELISA presenta la ventaja de poder procesar un mayor número de sueros en menos tiempo.

El propósito de nuestro trabajo fue en primer lugar, evaluar la sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA, y en una segunda etapa, utilizarla como herramienta diagnóstica para determinar la extensión de la *Brucella Ovis*. Los resultados fueron comparados con los obtenidos por la revisión clínica e inmunodifusión en gel.

MATERIALES Y METODOS

Diseño de muestra

El universo establecido fueron establecimientos que contaban con un número de ovinos entre 600 y 5000 los cuales representaban aproximadamente el 70% de la población ovina del país (Dicose* 1986). Se seleccionaron seis (6) departamentos con alta densidad de ovinos (Artigas, C.Largo, Lavalleja, Paysandú, Salto y Tacuarembó) los mismos contaban con Servicios Veterinarios Departamentales y zonales dependientes del Ministerio de Agricultura y Pesca. Se realizó un muestreo aleatorio simple, estratificado por establecimientos según el tamaño de la población ovina de la siguiente manera:

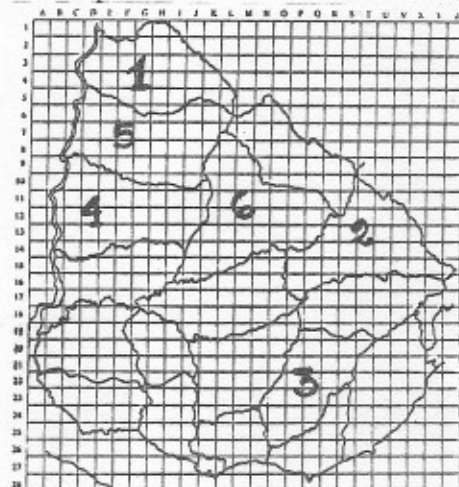
| ESTRATO | ESTABLECIMIENTOS |
|---------|-----------------------|
| I | de 601 a 1000 ovinos |
| II | de 1001 a 2500 ovinos |
| III | de 2501 a 5000 ovinos |

Los parámetros establecidos para su determinación fueron los siguientes, prevalencia estimada para la brucelosis ovina 10%, nivel de confianza del 95%, máximo error admitido 1%.

Según estos parámetros se obtuvo una muestra de 80 establecimientos, con un total de 2633 carneros muestreados, lo que representó el 2% de la población de carneros de los seis departamentos.

REFERENCIAS:

- 1- Artigas
- 2- Cerro Largo
- 3- Lavalleja
- 4- Paysandú
- 5- Salto
- 6- Tacuarembó



*Dirección de Control de Semovientes.

Tests serológicos

1 Test de Enzimoimmunoensayo (ELISA)

Se realizó un ELISA indirecto para detección de anticuerpos. Se utilizaron microplacas para ELISA (Immulon II, Dynatech, USA) las que fueron sembradas con diluciones seriadas (100 μ l pocillo) del extracto soluble salino de B Ovis (BoAe) (10 μ g/ml). un **conjugado** comercial de IgG de conejo anti ovina conjugada con peroxidasa a una dilución de 1/3000 fue también utilizado. Como **cromógeno** se utilizó 3-methyl-2-benzothiazolinone hidrazone hydrochloride monohydrate (MBTH) 1.8mM y 3-dimethylaminobenzoic acid(DMAB) 180 mM en buffer fosfato 0.1 M, pH 7.0 con 0.02 de peróxido de hidrógeno 30%

El desarrollo de color fue determinado por medidas de absorbancia a 492 nm (Titertek Multiskan Plus MKII)

Poblaciones estudiadas

Estudio de sensibilidad y especificidad. Los sueros pertenecieron a 57 carneros provenientes de establecimientos considerados libres de B. ovis y 48 carneros con **aislamiento** de B ovis a partir de semen. Los controles utilizados fueron 4 sueros con títulos conocidos de anticuerpos tres (3) positivos (alto, medio y bajo) y un (1) negativo. Se estudió la homogeneidad en el comportamientos de los sueros controles en diferentes placas por medio del análisis de varianza(ANOVA)

Estudio epidemiológico Los sueros pertenecieron a 2633 carneros que fueron conservados a 20°C para su posterior evaluación.

La totalidad de los sueros y los controles diarios (sueros con títulos conocidos de anticuerpos (alto, medio y bajo) fueron sembrados por triplicado en una dilución de 1/200 en todas las placas realizadas.

Se realizó el Estudio de Prevalencia y Análisis de Dispersión de B.Ovis por estratos y por departamentos

2. Inmunodifusión en gel

Se evaluaron por esta técnica los 2633 carneros, como es rutina en nuestro laboratorio. Como control se utilizó un suero con título conocido de anticuerpos

Se realizó el test de Student para estudiar las diferencias obtenidas entre ambas técnicas serológicas.

Exámen clínico

Los 2633 carneros fueron sometidos a evaluación clínica.

Estudio comparativo.

Se comparan los resultados obtenidos por la técnicas de ELISA y Gel Difusión con el exámen clínico

RESULTADOS

Muestreo

Los 80 establecimientos muestreados y los 2633 carneros chequeados se distribuyeron según lo indica la tabla 1

Test de Elisa

Estudio de sensibilidad y especificidad

La **sensibilidad** (con umbral 251) fue de 93.9%, el test detectó como negativos tres (3) animales de la población positiva estudiada y la **especificidad** fue de 96.5%, detectándose como positivos dos (2) animales de la población negativa.

Estudio epidemiológico

La **dispersión** de la Brucella Ovis para el total de los establecimientos fue de 32.5% y su intervalo al 95% de confianza fue de $10.4 < 32.5, < 54.6$

La distribución por estratos fue de 24.4% en el estrato 1, 39,1% en el estrato 2 y 50% en el estrato 3.

La **prevalencia** respecto al **total de establecimientos** de los seis (6) departamentos estudiados fue de 13.2% y su intervalo de confianza al 95% fue de $8.2\% < 13.2 < 18.2\%$

La **prevalencia en establecimientos positivos** fue de 35.5% en el estrato 1, 36.8% en el estrato 2 y 25.8% en el estrato 3 según se muestra en cuadro 1.

Test de student

Las diferencias obtenidas entre las dos técnicas serológicas ELISA 13.2% y Gel

difusión 11.1% no fueron significativas ($P < 0.05$)

Exámen clínico reproductivo

De los 2633 carneros surgen 154 (5.8%) con epididimitis, los mismos pertenecieron a 39 establecimientos (48.8%) del total estudiado

Estudio comparativo

El resultado del estudio comparativo entre el exámen clínico (Epididimitis) y la prueba de Elisa por predios y por animales se expresa en los cuadros 2 y 3

La correlación entre Gel Difusión y ELISA en predios donde se realizó diagnóstico serológico positivo de *B Ovis* se muestran en cuadro 4 a y b

Tabla 1

| DEPARTAMENTOS | N° DE ESTABLECIMIENTOS | | | N° DE ANIMALES |
|---------------|------------------------|---------------|-----|----------------|
| | Estratos | Total / Depto | | |
| | I | II | III | |
| Artigas | 8 | 4 | 2 | 402 |
| Cerro Largo | 9 | 3 | - | 308 |
| Lavalleja | 8 | 3 | - | 269 |
| Paysandu | 6 | 8 | 1 | 560 |
| Salto | 2 | 3 | 7 | 692 |
| Tacuarembó | 12 | 2 | 2 | 402 |
| Totales | 45 | 23 | 12 | 2633 |

Cuadro 1 Prevalencia respecto al total de establecimientos

| DEPARTAMENTO | PREVALENCIA POR ESTRATOS (%) | | | |
|--------------|------------------------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| | 1 | 2 | 3 | Total |
| ARTIGAS | 6.5 | 14.7 | 23.2 | 15.4 |
| CERRO LARGO | 9.8 | 17.2 | . | 13.2 |
| LAVALLEJA | 6.7 | 22.0 | . | 14.1 |
| PAYSANDU | 13.5 | 17.2 | 0 | 13.2 |
| SALTO | 41.3 | 9.4 | 13.6 | 14.7 |
| TACUAREMBO | 10.7 | 0 | 9.0 | 8.5 |
| TOTAL | 14.9±13.3 | 13.4±7.7 | 11.5±9.7 | 13.2 ± 2.5 |

Cuadro 2. Comparación de los resultados obtenidos por establecimientos de la revisión clínica (epididimitis) el test de ELISA

| DEPARTAMENTO | EPIDIDIMITIS | | ELISA | |
|----------------|--------------|-----------|-----------|-----------|
| | NEGATIVA | POSITIVA | NEG | POS |
| ARTIGAS | 9 | 5 | 1 | 4 |
| CERRO LARGO | 6 | 6 | 3 | 3 |
| LAVALLEJA | 8 | 3 | 0 | 3 |
| PAYSANDU | 6 | 9 | 3 | 6 |
| SALTO | 3 | 9 | 3 | 6 |
| TACUAREMBO | 9 | 7 | 4 | 3 |
| TOTALES | 41 | 39 | 13 | 26 |
| | | | 41 | 0 |

Cuadro 3. Comparación de los resultados **por animales**, de la revisión clínica y el test de ELISA.

| DEPARTAMENTO | EPIDIDIMITIS | | ELISA | |
|--------------|--------------|----------|----------|----------|
| | NEGATIVA | POSITIVA | NEGATIVA | POSITIVA |
| ARTIGAS | 387 | 15 | 8 | 7 |
| CERRO LARGO | 293 | 15 | 339 | 48 |
| LAVALLEJA | 258 | 11 | 4 | 11 |
| PAYSANDU | 528 | 32 | 264 | 29 |
| SALTO | 634 | 58 | 1 | 10 |
| TACUAREMBO | 379 | 23 | 230 | 28 |
| | | | 11 | 21 |
| | | | 475 | 53 |
| | | | 22 | 36 |
| | | | 568 | 66 |
| | | | 9 | 14 |
| | | | 359 | 20 |
| TOTALES | 2479 | 154 | 55 | 99 |
| | | | 2235 | 244 |

Cuadro 4 a y b. Incidencia de afecciones de epidídimo en establecimientos con serología positiva a B.Ovis.

a. Comparación de clínica y serología (gel y elisa), por total (1054) de animales.

| EPIDIDIMITIS | | ELISA | | GEL | |
|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| NEGATIVO | POSITIVO | NEGATIVO | POSITIVO | NEGATIVO | POSITIVO |
| 932 | 122 | 23 | 99 | 42 | 80 |
| | | 688 | 244 | 702 | 230 |

b Comparación de la serología (Gel y ELISA)

| GEL DIFUSION | | ELISA | |
|--------------|----------|----------|----------|
| NEGATIVO | POSITIVO | NEGATIVO | POSITIVO |
| 744 | 310 | 63 | 247 |
| | | 648 | 96 |

DISCUSION

El trabajo se realizó de acuerdo al Censo Nacional (DICOSE) 1986. Los sueros fueron procesados en el año 1991 en nuestro laboratorio, en dicho año, se realizó un nuevo censo en el país, no habiéndose presentado cambios sustanciales, por lo que los resultados serían extrapolables a esa fecha.

Los resultados del ELISA en lo que refiere al estudio de sensibilidad y especificidad, si bien se utilizó otro criterio para la selección de la población de referencia positiva, los resultados no difieren mayormente con los obtenidos en un estudio anterior (18). Existen varios trabajos que, utilizando extractos salinos como antígenos, determinan la sensibilidad y especificidad de la prueba de Enzimoimmunoensayo. Los resultados obtenidos varían en un rango de 83.4 a 100% en sensibilidad y 92 a 100% en lo que a especificidad respecta (11) (15) (21). Lo que se puede atribuir a que los sueros evaluados provienen de situaciones epidemiológicas diferentes. Datos actuales (comunicación personal Dr. Moriyón) indican que el ELISA ha mejorado en su especificidad, al utilizar conjugados monoclonales Anti Ig G1 y conjugados con proteína G.

En lo que respecta al estudio de repetibilidad intraplaca de los sueros controles, se considero que en general el coeficiente de variación (%CV) obtenido fue bajo, lo que indicó un comportamiento homogéneo de la placa, siendo el valor más alto de 13.7 para el suero negativo en una de las placas, lo cual no fue relevante.

El resultado del estudio de repetibilidad interplaca de los sueros controles en las diferentes placas, denota que el mismo fue aproximadamente constante con coeficientes de variación de 7.2 a 16.5%.

Para confirmar si las siete (7) placas se comportaron como una misma población, se realizó el análisis de varianza de los sueros controles y se demostró que las diferencias interplaca no fueron significativas.

El análisis de la dispersión de la Brucellosis en los 6 departamentos muestreados indica que Paysandú y Salto son los departamentos más afectados con 40% y 50% de establecimientos

infectados, siendo la dispersión promedio de 32.5%

En el estudio de prevalencia de los establecimientos positivos, se observa una mayor prevalencia en los estratos 1 y 2, siendo ésta estadísticamente significativa, sería difícil aventurar una opinión sobre esa variación, pero situaciones de manejo en los estratos podrían explicar estos resultados

La prevalencia en el total del área fue de 13.2%. Se pueden observar igualmente diferencias de acuerdo a los estratos, disminuyendo en general las prevalencias al aumentar el tamaño de la población del establecimiento, mereciendo el mismo comentario del párrafo anterior

Estudios parciales realizados en años anteriores (3) mostraron índices de prevalencia cercanos al 50% de establecimientos infectados y 10% de carneros en dichos predios. Si bien los mismos no representaban la realidad nacional por las características del muestreo, ya se mostraba una alta distribución de la enfermedad.

Si bien los resultados del análisis clínico y Elisa no fueron superponibles, el estudio demuestra que hay una amplia distribución de la enfermedad en el país

El análisis del cuadro 3 muestra que no existió una alta correlación de la epididimitis clínica con la técnica de ELISA, a nivel individual (carneros) la misma fue de (154 -99) en el total de los departamentos, pudiéndose deber a procesos crónicos con encapsulamiento del proceso infeccioso o a errores en el diagnóstico clínico. En tanto el mismo cuadro demostró que 244 animales que no presentaron clínica fueron Elisa positivos, lo que es un resultado esperado, ya que puede tratarse de otras localizaciones del proceso infeccioso o así mismo de infecciones recientes.

En catorce establecimientos estudiados (17%) se presentó epididimitis, siendo negativa la serología a *Brucella Ovis*

Al analizar los dos resultados mencionados anteriormente donde se presentan resultados con lesiones clínicas sin serología a *B. Ovis*, se podría interpretar otras causas capaces de producir una sintomatología similar a la infección de *B. ovis*. Si bien a nivel individual, la prevalencia es baja, a nivel de predios podría ser significativa. Esto haría suponer que dichas afecciones están localizadas en algunos predios y no tendrían la distribución que presenta la infección a *B. ovis* como lo demuestra este estudio.

La determinación de la etiología que determina este signo podría ser motivo de otro estudio, la bibliografía internacional así lo indica (22). Es de destacar que en nuestro país han sido determinados predios con lesiones clínicas a epididimitis habiéndose aislado *A. seminis* (23). Pero, sin embargo, si analizamos los resultados, vemos que la incidencia clínica es baja y que además se describen lesiones clínicas de granulomas en epidídimo lo que nos haría pensar que las epididimitis corresponderían a otras causas no infecciosas (traumas) o a la presencia de afecciones de tipo genético (24).

Al analizar el cuadro cuatro (4a) se observa que el análisis clínico detectó una menor cantidad de animales enfermos que la serología, ese resultado es esperado, ya que la clínica no detecta todos los animales infectados, pudiendo llegar a individualizar entre un 30 a 60% de los mismos (2)

Dentro de las técnicas serológicas, el ELISA resultó más sensible (11) (14) (24), no siendo sin embargo reflejada estadísticamente esta diferencia, en la totalidad del estudio

En nuestro caso además el ELISA correlacionó más estrechamente con la clínica tal cual se ve en el cuadro siete (4a)

Ambas técnicas serológicas presentaron resultados no superponibles, tal cual se muestra en el cuadro siete (4b)

Es de destacar lo ya dicho por otros autores (11) en el sentido que ningún test serológico detecta el 100% de los animales infectados, por lo que se recomienda el uso de más de una técnica en este caso el uso de la Gel Difusión y el ELISA para llegar a un 100% de sensibilidad

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Sr J Echevarne por realizar el estudio estadístico, V F Silvera y E Mautone por asistencia técnica, Dr E Lorenzelli y A Castrillejo por proveer los sueros negativos, Dres V Neirotti y L Carretto por la preparación del antígeno para Gel Difusión

El muestreo fue financiado por CONASA (Comisión Nacional de Salud Animal)(MGAP)

El proyecto fue financiado por la International Foundation for Science (IFS) Suecia Contrato de Investigación Nro 1428

REFERENCIAS

- 1.- SUL Secretariado Uruguayo de la Lana Noticias 1987 Nro 86 Fuente Departamento de Información e Investigación económica del SUL
- 2.- CASAS OLASCOAGA,R 1969 Ed bolsa del Libro Facultad de Veterinaria Montevideo,Uruguay
- 3.- MEMORIA ANUAL 1971 Centro de Investigaciones Veterinarias "Miguel C Rubino
- 4.- BERMUDEZ,J ,BARRIOLA,J ,CUENCA,L ,RIET CORREA,F ,STOLOVAS, A. 1980 Brucellosis ovina.estudio de un brote y esquema de control.sociedad de Medicina Veterinaria,Vol XVI, Nro 72, pags 31-37
- 5.- DURAN DEL CAMPO,A 1985 Causales de bajo procreo ovino en el Uruguay v consideraciones sobre problemas de fertilidad en carneros Folleto del Ministerio de Ganaderia Agricultura y Pesca
- 6.- PELLERIN,J L 1987 Rapport de Mission sur L'Epididymite contagieuse du belier en Uruguay (Infection a Brucella Ovis) Ministerio de Ganaderia Agricultura y Pesca,Uruguay
- 7.- BLOOD,D C ,RADOSTITIS,O M , HENDERSON,J A 1983 Veterinary Medicine.6th ed.pags.615-618 Bailliére Tindall, London
- 8.- ANIMAL HEALTH REFERENCE LABORATORY, WALLACE VILLE ANIMAL RESEARCH CENTER 1983 The complement fixation test for the diagnosis of B ovis infection in Rams.Animal Health division report N Z vet.J 31 157-160
- 9.- MYERS, D.M., JONES,L M , VARELA-DIAZ,V M 1972 Studies of antigens for complement fixation and cgel diffusion test in the diagnosis of infections caused by Brucella ovis and others Brucella. Appl.Microbiol.23 157-902.
- 10.- ALTON,G.G.,JONES,L.M.,PITZ,D.E.1975 Laboratory techniques un Brucellosis World Health Organization,Ginebra, 2th edition.
- 11.- MARIN,C.M., JIMENEZ de BAGUES,M.P , BLASCO,J.M., GAMAZO,C , MORIYON, I., DIAZ,R.1989 Comparison of three serological test for Brucella ovis infection of rams using different antigenic extracts. Vet.Rec. 125 504-508
- 12.- RAHALEY,R.S.;DENNIS,S.M.;SMELTZER,M.S. 1983 Comparison of the Ezyme linked immunosorbent assay and complement fixation test for detecting Brucella Ovis antibodies in sheep. Vet. Rec 112:467-470.

- 13.- AFZAL,M ,TENGERDY,R P ,SQUIRE,P G ,ELLIS,R P 1984 Characterization of *Brucella Ovis* lipopolysaccharide and its use for diagnosis of ram epididymitis by enzyme-linked immunosorbent assay *J Clin Microbiology* 20 1159-1164
- 14.- SPENCER,T L ,BURGESS,G 1984 Enzyme- linked immunosorbent assay for *Brucella ovis* specific antibody in ram sera *Res Vet Sci* 36 194 -198
- 15.- RIEZU-BOJ,J I ,MORIYON,I ,BLASCO,J M ,MARIN,C M ,DIAZ,R 1986 Comparison of lipopolysaccharide and outer membrane proteins-lipopolysaccharide extracts in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella Ovis* infection *J Clin Microbiol* 23(5) 938-942
- 16.- LEE,K ,CARGILL,C ,ATKINSON,H 1985 Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella Ovis* infection in rams *Australian Veterinary Journal*,62(3)
- 17.- VOLLER,A , BIDWELL, D E and BARLETT The Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) a guide with abstract of microplate application Nuffield Laboratories of Comparative Medicine.Reagents Park London N W 1, 1979
- 18.- SILVA PARAVIS,M ,MULLER G, ROSSI S ,TONNA H ,SILVERA V ,CARRFLO L *Brucella ovis* desarrollo de una técnica de ELISA para diagnóstico serológico en Uruguay En Imprenta en Revista Latinoamericana de Peq Rumiantes México
- 19.- Técnica de difusión en gel de agar para el diagnóstico de la epididimitis de los carneros 1979 Nota técnica Nro 20 OPS-OMS-CEPANZO
- 20.- CASTRILLEJO, A y Col Relevamiento clínico de aptitud reproductiva en carneros *Veterinaria* 26(108) abril-Junio 1990
- 21.- WALKER,R L ,LEAMASTER,B L ,S STELLFLUG,J N and BIBERSTEIN,E I Use of enzyme -linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Brucella ovis* in sheep field trial.*Am.J Vet.Res.*46(8),1985
- 22.- JASEN,B.C., The aetiology of ram epididymitis Onderspoort *J Vet Res* 47 101-107 1982
- 23.- BERMUDEZ,J ,BARRIOLA J ;CUENCA, L ;CASTRILLEJO, A Aislamiento de Bacilos pleomórficos gram negativos .I Jornadas de Ovinos 1979 I Jornadas de Ovinos
- 24.- WATT D.A Testicular Abnormalities and Spermatogenesis of the Ovine and other Species. *Veterinary Bulletin* 42(4) April 1972

- 25.- WORTHINGTON,R W ,STEVENSON;B J and LISLE,G W de Serology and semen culture for the diagnosis of Brucella Ovis infection in chronically infected rams New Zealand Veterinary Journal 33,84